

RUXXA3
Patent Information

RO 78083 B 8111130

Application Information

RO 79-97324 790420

BEST AVAILABLE COPY

Abstract

A .gamma.-globulin conc. is obtained from whey, colostrum, or blood serum, by fractional pptn. Thus, 1 L serum is adjusted to an ionic strength of 0.2

/ with NaCl, followed by the addn. of 80 mL 13% Na polyphosphate, treatment with HCl to pH 4.1-4.3, centrifuging, and adjusting the supernatant to pH

3.5-3.8, to obtain a .gamma.-globulin ppt. The pH of the ppt. is adjusted to 7.4 with NaOH, followed by the addn. of water to a protein content of

10-12%. The .gamma.-globulin prep. decreased the rate of mortality when injected in newborn piglets.

International Patent Classification

A61K035-14

Document Type

Patent
Language



III DESCRIEREA INVENTIEI 78083

(51) Complementară la invenția nr. :

(21) Dosar nr. : 97324

(22) Data înregistrării : 20.04.1979

(30) Prioritate convențională :

(32) Data :

(33) Tara :

(31) Certificat nr. :

(45) Data publicării : 30.11.1981

(51) Int. cl. A-61 K 35/14

(71) Solicitant :

ing. Aureliu Contrea,
Timișoara

(72) Inventator :

ing. Aureliu Contrea,

(73) Titular :

Institutul agronomic,
Timișoara

154) Procedeu de obținere a unui concentrat gamaglobulinic de uz veterinar

Invenția se referă la un procedeu de prelucrare a unor lichide biologice de origine animală (sângere, colostru, zer, lichid placental, homogenate, celulare și tisulare etc), în vederea obținerii unui concentrat proteinic în compoziția căruia predomină imunoglobulinele cu rol de anticorpi, alături de metaloproteide de tipul transferinelor, utile în trata'mentul animalelor tinere afectate de sindromul de deficiență în anticorpi sau de anemie feriprivă.

Este cunoscut procedeul de preparare a gamaglobulinelor prin precipitare fracțională la rece cu alcool prin variația pH-ului și a concentrației în alcool. Acest procedeu necesită instalații frigorifice costisitoare și în faza finală operații de liofilizare industrială ceea ce îl face nerentabil în aplicare pe scară largă în medicina veterinară.

Este cunoscut și procedeul de preparare a gamaglobulinelor prin precipitare cu rivanol. Acest procedeu necesită un reactiv scump și greu accesibil rivanolul, care se prepară prin sinteză complicată sau se importă.

Este cunoscut și procedeul de preparare a gamaglobulinelor prin precipi-

10 tare cu sulfat de amoniu sau alte săruri anorganice. Acest procedeu este dezavantajos prin faptul că durează un timp indelungat și necesită operații de dializă pentru îndepărarea sărurilor din soluție, iar sulfatul de amoniu este, de asemenea, un reactiv relativ scump.

Este cunoscută și folosirea polifosfătilor pentru separarea proteinelor de origine animală solubile în apă din lichide biologice, dar această tehnică nu separă în mod selectiv imunoglobulinele de albumine și de alte globuline prezente în lichidele biologice.

Procedeul de obținere a concentratului gamaglobulinic, potrivit invenției, înălță dezavantajele de mai sus, prin aceea că, în scopul obținerii prin operații simple și economice a unui preparat suficient de pur și cu o înaltă activitate imunologică, sunt reținuți cu ajutorul rășinilor cationice din lichidul biologic, ionii de calciu și magneziu, care jenează precipitarea și prinț-o potrivire corespunzătoare a tăriei ionice și a pH-ului soluției la valori determinate se asigură o precipitare fracțională selectivă a albuminelor și a unor globuline cu ajutorul unei soluții de

polifosfat de sodiu, iar complexul albumină-polifosfat se separă prin centrifugare.

Se dau mai jos trei exemple de realizare a invenției din singele de porc și din zerul de lapte sau colostru de bovine :

Exemplul 1. Serul sanguin se aduce la o forță ionica de 0,2 prin adăugarea a cîte 2,86 g NaCl pentru fiecare litru de ser. Se adaugă suu agitare în picături 80 ml soluție de polifosfat de sodiu 13% pentru fiecare litru de ser și se acidulează cu HCl N în picături și sub agitare continuă pînă la un pH cuprins între 4,1...4,3 în funcție de puritatea necesară a concentratului și de randamentul în gamaglobulină urmărit. Separarea albuminelor și a alia și betaglobulinelor de gamaglobuline se realizează în interval de pH menționat astfel: la pH=4,25...4,30 precipita albuminele și cu o mică parte din globuline, iar în supernatantul globulinic rămin ca impurități urme de albumine și alfa și betaglobuline; în schimb la pH=4,10...4,15 precipitatul albuminic este imbogățit în globuline, iar supernatantul gamaglobulinic este fibră de albumine și alte globuline, dar cu un randament mai scăzut, deoarece o parte din gamaglobuline s-au precipitat odată cu albuminelo.

În practică se recomandă a se lucra la un pH intermediar (4,15...4,25) în funcție de puritatea și de randamentul dorit. Precipitatul albuminic se centrifughează la 2 500...3 000 rot/min timp de 30...50 min. Supernatantul se separă prin aspirație cu ajutorul vidului, și se adaugă încă 40 ml soluție de polifosfat de sodiu 13% pentru fiecare litru de lichid și se acidulează prin adăugare în picături și sub agitare soluție de HClN pînă la pH=3,5...3,8.

Toate operațiile se efectuază la temperatură laboratorului și sub controlul riguros al pH-ului, fie cu un potențiometru de precizie (pH=0,02), fie cu ajutorul unui aparat de titrare automată. Se centrifughează din nou suspensia la 2 500...3 000 rot/min timp de 15...30 min.

Supernatantul se aspiră și se aruncă.

Precipitatul gamaglobulinic obținut de la 1 l de lichid se reia cu 6...10 ml apă distilată sterilă și se amestecă bine obținindu-se un omogenizat căruia i se adaugă sub agitare piratul cu picături soluție de NaOH N pînă la dizolvarea precipitatului, care face operația o valoare a pH-ului de 6,5...5,5 și adaugă în continuare NaOH N sub con-

trol potențiometric pînă la pH=7,4. După dizolvarea completă a precipitatului care are loc de obicei pînă la două zile după păstrare la frigider, se reduce pH-ul la 7,4 cu NaOH N.

Se determină proteinele refractometric sau prin altă metodă și se aduce concentrația în proteină totală a concentratului la 10,5% prin diluare cu ser fiziologic steril.

Exemplul 2. Se recoltează singele de la sacrificarea normală a animalelor sau prin puncție venoasă în recipiente clătite cu soluție de mertiolat 1 : 10 000 peste o soluție de citrat de sodiu 5% în raport de un volum soluție de citrat la 9 volume de singe.

Se centrifughează 15 min la 2 500...3 000 rot/min pentru separarea plasmăi.

Plasma se prelucrează cum s-a descris în exemplul 1 pentru serul sanguin fără a se mai adăuga NaCl pentru corectarea forței ionice, deoarece are forță ionică corespunzătoare. Randamentul în gamaglobulină este superior în cazul plasmăi față de ser, dar necesită o centrifugare în plus.

Exemplul 3. Laptele sau colostrul se centrifughează pentru separarea grăsimii.

Laptele sau colostrul smintinit se acidulează la pH=4,6 pentru precipitarea caseinei sau se tratează cu renină și se centrifughează pentru separarea caseinei. Zerul se trece printr-o coloană de răsină schimbătoare de ioni cationică în fază Na⁺ pentru reținerea ionilor de Ca²⁺ și Mg²⁺ și se aduce la forță ionică 0,2 prin adăugare de NaCl sau prin diluare după caz, sub control crioscopic, sau conductometric și se adaugă 80 ml soluție de polifosfat de sodiu 13% pentru fiecare litru de zer și se prelucrează cum s-a descris în exemplul 1 pentru serul sanguin. În cazul colostrului concentratul gamaglobulinic obținut este deosebit de bogat în IgA. Administrarea acestuia se poate face, de asemenea, pe cale orala, parenterală sau combinată singur sau în asociere cu gamaglobulinele sanguine.

Concentratul gamaglobulinic obținut prin procentul potrivit invenției din singele porcilor sacrificiați normal și administrat la porcii în primele ore sau cel mai tîrziu la o zi după naștere, au dus la reducerea mortalității neonatale (pînă la vîrstă de 14 zile) în funcție de cale de administrare, comparativ cu plinderile din loțurile mărtor, după cum se vede în tabelul următor :

Calea de administrare a concentratului gammaglobulinic	Lot experimental			Lot martor		
	Nr. purcei	Pierderi înregistrate	Nr. %	Nr. purcei	Pierderi înregistrate	Nr. %
Administrare per os 5 ml	360	40	10,84	363	44	12,12
Administrare subcutan 5 ml	453	58	12,80	436	67	15,36
Administrare combinată 3 ml per os și 2 ml subcutan	233	29	12,44	237	61	25,73
Total general	1 055	127	12,03	1 036	172	16,60

Reducerea mortalității neonatale la purcei (pînă la vîrstă de 14 zile) prin administrare de concentrat gammaglobulinic pe diverse căi, comparativ cu pierderile la loturile martor.

Aplicarea invenției aduce următoarele avantaje:

— se reduc mortalitățile și imbolnăvirile tineretului animal cu 10...26% în funcție de modul de administrare și de situația epizootologică a unității;

— se utilizează drept materie primă, atât singele provenit din sacrificările normale, sau prin recoltări de la animalele adulte imunizate sau chiar neimunizate din cadrul acelorași unități de creștere în care se administrează concentratul în scop curativ sau profilactic la tineret, ceea ce asigură prezența în concentrat a anticorpilor specifici bolilor infecțioase din zona respectivă, cît și zerul de lapte sau colostru;

— tehnologia de preparare a concentratului gammaglobulinic este simplă și economică întrucât necesită un număr restrins de operații (precipitare fraccională sub control pH-metric, centrifugare, trecere peste coloană de schimbători de ioni etc.) și nu necesită temperaturi scăzute de lucru cum este cazul metodelor bazate pe precipitare și fraccională cu alcool;

— utilizează substanțe ieftine și accesibile;

— concentratul poate fi administrat direct per os sau parenteral fără a fi necesară reținerea polifosfatului rezidual.

Revenire

Procedeu de obținere a unui concentrat gammaglobulinic de uz veterinar, caracterizat prin aceea că se obține prin tratarea serului sau plasmei sanguine sau a zerului de lapte sau colostru adus în prealabil la forță ionică 0,2 cu sau fără trecerea peste rășini cationice cu o soluție de polifosfat de sodiu 12...13% și acidularea cu HCl pînă la pH=4,10...4,30, iar după separarea precipitatului albuminic prin centrifugare se continuă acidularea cu HCl pînă la pH=3,5...3,8 urmat de centrifugarea și reluarea precipitatului gammaglobulinic cu apă distilată și neutralizarea terciului obținut cu NaOH pînă la pH=7,4 și diluare cu apă distilată pînă la o concentrație în proteină totală de 10...12%.

(56) Referințe bibliografice

Brevete, S.U.A., nr. 2377624; 2726235
Brevet, Canada, nr. 790580

Președinte comisie invenție: chim. Georgeta Tenea

Examinator: farm. Aurica Coraci